

München, 1960

**Über die osmotische Inaktivierung
von Natrium- und Kaliumionen
in Gegenwart von Eiweißkörpern**

MONIKA RJOSK

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. H. Schwiegk

Über die osmotische Inaktivierung von Natrium- und Kaliumionen in Gegenwart von Eiweißkörpern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

verfaßt

und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

MONIKA RJOSK

aus Berlin

München 1960

Mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:

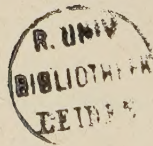
PRIV.-DOZ. DR. E. BUCHBORN

Korreferent:

PROF. DR. H. SCHWIEGK

Dekan:

PROF. DR. H. SCHWIEGK



Tag der mündlichen Prüfung:

21. Juni 1960

GLIEDERUNG

	Seite
A. Einleitung	4
B. Methodik und Material	4
I. Methodik	4
1. Die Messung der Gefrierpunktserniedrigung	5
2. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit	5
II. Material	6
1. Untersuchtes Material	6
2. Herstellung der untersuchten Lösungen	6
a) Eiweißvorbereitung	6
α) Dialyse	6
β) Elektrolytbestimmung	7
γ) Eiweißbestimmung	7
δ) Herstellung des elektrolytfreien Wassers	8
b) Salzvorbereitung	8
C. Messungen	8
1. Salze in Wasser gelöst	8
a) Messung der Gefrierpunktserniedrigung	8
b) Messung der Leitfähigkeit	9
2. Salze in Humanalbuminlösungen	11
a) Messung der Gefrierpunktserniedrigung	11
b) Messung der Leitfähigkeit	13
c) Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom Alter der Lösungen	13
d) Abhängigkeit der Gefrierpunktserniedrigung vom pH der Lösungen	16
3. Salze in Pseudoglobulinlösungen	17
4. Salze in Rinderalbuminlösungen	18
5. Salze in Pferdealbuminlösungen	19
D. Auswertung der Meßergebnisse	19
1. Gefrierpunktserniedrigung von 0,5 g% HA + 400 mval KCl	20
2. Leitfähigkeit von 0,5 g% HA + 400 mval KCl	20
E. Diskussion	23
F. Zusammenfassung	27
G. Literatur-Verzeichnis	30

A. Einleitung

Für die intracellulären Stoffwechselvorgänge ist die Aufrechterhaltung einer optimalen Konzentration der in und außerhalb der Zelle gelösten Elektrolyte und z. T. auch Nichtelektrolyte, wie z. B. Glukose, notwendig. Konstant gehalten werden diese Konzentrationen hinsichtlich der Elektrolyte im extracellulären und dadurch sekundär auch im intracellulären Raum durch die endokrin gesteuerte fakultative Elektrolyt- und Wasserrückresorption in den distalen Nierentubuli. Der quantitativ und biologisch entscheidende Elektrolyt im extracellulären Raum sind die Natriumionen, im intracellulären als wichtigstes Kation die Kaliumionen. Das wesentliche Anion im extracellulären Raum ist das Chlor, im intracellulären sind es Phosphate und Proteinate. Da die Flüssigkeitsbewegungen im Organismus zwischen den einzelnen Wasserräumen u. a. weitgehend von osmotischen Druckgradienten abhängig sind, ergab sich im Rahmen der mit der Regulation des Wasserhaushaltes zusammenhängenden Probleme die Frage, ob die für den Organismus wichtigen Ionen dieser Art (Na^+ und K^+) in Gegenwart von derartigen Eiweißen wechselnde Anlagerungen an diese Proteine erfahren und dadurch osmotisch inaktiviert werden können. Damit wäre die aus anderen Überlegungen gefolgerte Teilnahme vor allem intracellulärer Eiweiße an der Osmoregulation des Wasserhaushaltes wahrscheinlich gemacht. Da die meisten intracellulär vorkommenden Proteine Albuminstruktur haben, wurde in der vorliegenden Arbeit das osmotische Verhalten von Alkaliionen in Albuminlösungen untersucht.

Es ist nun seit längerer Zeit bekannt, daß Eiweißstoffe Metallionen binden und damit osmotisch unwirksam machen können (Klotz 1). Bei den Übergangsmetallen ist dieses Bindungsvermögen sehr stark. Bei den Erdalkalitionen entspricht es der Affinität von kleinen Liganden für dieses Ion (Neurath und Bailly 2).

Eine Bindung von Alkaliionen an Eiweißstoffe konnte früher zunächst nicht bewiesen werden, und erst neuerdings wird für Kaliumionen im Gegensatz zu Natriumionen die Möglichkeit einer Bindung an Proteine diskutiert (Lehnartz 3, Welt, Orloff, Kydd, Olzman 4, Elkinton, Winkler, Danowski 5).

Quantitative Untersuchungen zu dieser Frage liegen bisher kaum vor. Als Ergänzung der Ergebnisse von Neunhöffer und Kabet (6) werden in der vorliegenden Arbeit in vitro qualitative und quantitative Untersuchungen angestellt, um zu prüfen, ob K^+ im Gegensatz zu Na^+ tatsächlich durch Albumin osmotisch teilweise inaktiviert werden.

B. Methodik und Material

I. Methodik

Die Osmolarität einer Salzlösung wird bestimmt durch die Konzentration der gelösten und freibeweglichen Ionen. Bewirken Eiweißstoffe eine Erniedrigung der Osmolarität von Natrium- oder Kaliumsalzlösungen infolge osmotisch inaktiver Anlagerung der Elektrolyte an die Proteine, so muß die Konzentration der freibeweglichen, d. h. osmotisch wirksamen Ionen kleiner werden. Zur Konzen-

trationsbestimmung reiner Salz- sowie Salz-Eiweißlösungen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet:

1. die Messung der Gefrierpunktserniedrigung,
2. die Messung der elektrischen Leitfähigkeit.

1. Die Messung der Gefrierpunktserniedrigung

Der Dampfdruck einer Lösung ist niedriger als der des reinen Lösungsmittels. Da die Dampfdruckerniedrigung proportional ist der Konzentration der gelösten Teilchen, kann man diesen Effekt zur Bestimmung von Konzentrationen osmotisch wirksamer Teilchen verwenden. Der Messung leichter zugänglich als die Dampfdruckerniedrigung ist die ihr proportionale Gefrierpunktserniedrigung. Verwendet man Wasser als Lösungsmittel, so gilt die Beziehung

$$\Delta T = 1,86 \cdot C$$

ΔT ist der Temperaturunterschied in Grad Celsius, bei der die Lösung im Vergleich mit reinem Wasser gefriert; C ist die Konzentration in Mol/liter.

Bestimmt wurde die Gefrierpunktserniedrigung mit der Beckmannschen Apparatur:

In einer Kältemischung (Eis/Viehsalz) von -2 bis -6°C befindet sich ein von einem Isoliermantel umgebenes Gefriergefäß, das mit einem Seitenarm zur Zufuhr der Lösungen versehen ist. In das Gefriergefäß taucht ein Beckmannthermometer mit einer Unterteilung von $1/100^\circ \text{C}$. Mit einem elektromagnetisch angetriebenen Rührer wird für eine gute Durchmischung der Lösung gesorgt. Der Gefrierpunkt wird dadurch bestimmt, daß man die etwa 1°C unter den zu erwartenden Gefrierpunkt unterkühlte Lösung durch Animpfen mit einem Eiskristall zur Kristallisation bringt. Durch die frei werdende Kristallisationswärme steigt der Quecksilberfaden im Thermometer im Augenblick des Gefrierens an und erreicht eine maximale Höhe. Dieser Wert wird als Gefrierpunkt abgelesen.

Für das reine Lösungsmittel wird der Gefrierpunkt als Bezugspunkt bzw. Nullwert auf die gleiche Art bestimmt. Die Differenz beider Werte ergibt die Gefrierpunktserniedrigung der untersuchten Lösung.

2. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit

Legt man an die Lösung eines Elektrolyten eine elektrische Spannung an, so leitet sie den Strom. Der Stromfluß kommt durch die Wanderung der Ionen in der Lösung zustande und ist proportional der Ionenkonzentration. Die Leitfähigkeit ist definiert als der reziproke Wert des Widerstandes. Man kann also aus dem Widerstand einer Lösung auf ihre Konzentration an Ionen schließen.

Die Messungen wurden mit dem Metrohm-Konduktometer E 182 der Metrohm AG, Herisau (Schweiz), durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe einer Wheatstone-

schen Brückenschaltung der Widerstand der Lösung in einer Meßzelle definierten Ausmaßes zwischen zwei Platinelektroden bestimmt.

Als Nullindikator dient ein magisches Auge. Der Widerstand hängt außer von der Flüssigkeit selbst von der Größe und dem Abstand der Elektroden ab. Diese konstant bleibenden Größen sind gleich der Widerstandskapazität C der Meßzelle. In unserem Fall war $C = 46,5 \text{ cm}^{-1}$.

Die spezifische Leitfähigkeit k berechnet sich nach der Formel

$$k = \frac{C}{R} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

wenn R der gemessene Widerstand der Lösung ist.

Da die Leitfähigkeit mit der Temperatur zunimmt (Änderung um 2% bei 1°C), wurden alle Messungen bei konstant 37°C durchgeführt. Dazu wurde die Meßzelle von Wasser umspült, das in einem Thermostaten auf 37°C gehalten wurde. Jede Messung wurde mindestens zweimal durchgeführt.

Differierten die Meßwerte bei der kryoskopischen Methode um mehr als $0,008^\circ \text{C}$ und bei der konduktometrischen Methode um mehr als $0,02 \Omega$ (mittlerer Fehler), wurden die Messungen wiederholt.

II. Material

1. Untersuchtes Material

Untersucht wurden NaCl und KCl in Konzentrationen von 100, 200, 300, 400 mval/l, gelöst in

1. Wasser;
2. Humanalbumin in Konzentrationen von 0,1; 0,25; 0,5 g%;
3. Pseudoglobulin 0,5 g%;
4. Rinderalbumin 0,5 g%;
5. Pferdealbumin 0,5 g%.

2. Herstellung der untersuchten Lösungen

a) Eiweißvorbereitung

α) Dialyse

Um die Eiweißlösungen frei von Elektrolyten zu erhalten, wurden sie gegen elektrolytfreies Wasser (s. unter δ) dialysiert. Das Albuminpräparat („Humanalbumin trocken reinst“ der Behringwerke) wurde in Wasser zu einer zweiprozentigen Lösung gelöst und im Kühlschrank in

einem Dialysierschlauch etwa 8 Tage in elektrolytfreies Wasser gehängt, das täglich erneuert wurde, so daß Natrium und Kalium in das umgebende Wasser diffundierten.

β) Elektrolytbestimmung

Nach einer Woche wurden Proben aus dem dialysierten Albumin entnommen und flammenphotometrisch auf Natrium und Kalium untersucht. Das Flammenphotometer nach Zeiss verbrennt die Lösungen in einer Acetylen-Sauerstoff-Flamme. Mit Spiegeln wird die von der Flamme ausgehende Strahlung über einen Monochromator, der für Natrium auf eine Wellenlänge von 590 mμ und für Kalium auf 770 mμ eingestellt ist, und einen Verstärker auf ein Anzeigegerät übertragen. Das Anzeigegerät ist auf Standardlösungen von 250 mval/l für Natrium und 10 mval/l für Kalium geeicht. Mit Hilfe der abgelesenen Dichte wird auf einer Eichkurve der Natrium- bzw. Kaliumwert bestimmt.

Die Dialyse wurde solange fortgesetzt, bis in der Eiweißlösung flammenphotometrisch kein Natrium und Kalium mehr nachgewiesen werden konnte.

γ) Eiweißbestimmung (H a l l m a n n 7)

Da während der Dialyse die zweiprozentige Eiweißlösung durch Eintritt von Wasser verdünnt wurde, mußte der Eiweißgehalt zum Ansatz der endgültigen Verdünnung neu bestimmt werden. Es wurde nach der Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl verfahren: Die Substanz wird verascht. Aus den entstehenden Ammoniumsalzen wird der Ammoniak durch Zusatz einer starken Base in Freiheit gesetzt und in eine bestimmte Säurevorlage destilliert. Diese wird mit NaOH titriert. 1 ccm der vorgelegten Säure entspricht 0,28 mg Stickstoff. Die verbrauchte Natronlauge wird von der vorgelegten Säuremenge subtrahiert und die Differenz mit 0,28 multipliziert, um den Stickstoffgehalt der Lösung in mg zu erhalten. Da im Albumin 16,03 Prozent Stickstoff enthalten sind, erhält man die Albuminkonzentration der Lösung durch Multiplikation des Stickstoffgehaltes mit $100 : 16,03 = 6,24$.

Die Herstellung der anderen Eiweißlösungen war analog.

Bei der Rinderalbuminlösung gingen wir aus von „Serumalbumin vom Rind, trocken reinst“ (Behringwerke). Das Pferdealbumin war eine Sonderanfertigung der Behringwerke mit der Bezeichnung „Reines Albumin vom Pferd getrocknet“.

Bei der Herstellung der Pseudoglobulinlösung gingen wir aus von „5 g/o-Globulinlösung der Behringwerke“. Bei der Dialyse fielen beim Eintritt von Wasser die nicht wasserlöslichen Euglobuline aus (H e i l m e y e r 8), während die Pseudoglobuline in Lösung blieben. Sobald die Lösung

elektrolytfrei war, wurde sie filtriert und das nur noch Pseudoglobuline enthaltende Filtrat, wie bei den Albuminen beschrieben, weiterbehandelt. Der Stickstoffgehalt der Globulinlösung beträgt 15,95 Prozent. Daraus errechnet sich die Globulinkonzentration der Lösung durch Multiplikation des Stickstoffgehaltes mit $100 : 15,95 = 6,27$.

δ) Herstellung des elektrolytfreien Wassers

Aqua bidestillata wurde über einen Ionenaustauscher gefiltert und zugleich auf eine neutrale Reaktion gebracht. Verwendet wurde Lewatit der Firma Bayer. Das Filtrat war flammenphotometrisch frei von Natrium und Kalium. Mit diesem elektrolytfreien Wasser wurden die Eiweißlösungen auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

b) Salzvorbereitung

Natriumchlorid und Kaliumchlorid cryst. pro analysi von Merck wurden etwa 2 Stunden bei 100°C getrocknet und bis zum Erkalten im Exsikkator aufbewahrt.

Danach wurden Mengen von 100, 200, 300, 400 mval/l eingewogen und in den Eiweißlösungen gelöst.

C. Messungen

1. Salze in Wasser gelöst

a) Messung der Gefrierpunktserniedrigung

Nach der oben angeführten Beziehung

$$\Delta T = 1,86 \cdot C$$

sollte für eine NaCl-Lösung, die 100 mval/l enthält, eine Gefrierpunktserniedrigung von $2 \times 0,1 \times 1,86 = 0,372^{\circ}\text{C}$ gemessen werden, sofern NaCl als starker Elektrolyt in verdünnter Lösung vollständig in zwei freibewegliche Ionen dissoziiert.

Wie die Gegenüberstellung der berechneten und gefundenen Werte zeigt, liegen die gefundenen Werte zu niedrig (Tabelle 1). Diese Abweichung wird dadurch erklärt, daß in diesem Konzentrationsbereich die Gleichung, die unter der Voraussetzung der Gültigkeit der „Allgemeinen Gasgleichung“ (Gay-Lussac und Boyle-Mariotte) abgeleitet ist, nicht mehr genau erfüllt wird. Die allgemeine Gasgleichung gilt genau nur bei unendlicher Verdünnung, bei der sich alle Moleküle völlig unabhängig voneinander bewegen. Mit zunehmender Konzentration beeinflussen sich die Moleküle gegenseitig. Daher wären die Konzentrationen durch „Aktivitäten“ zu ersetzen, die der Ausdruck für die Abweichung vom Zustand der idealen Lösung sind.

**Tab. 1: Gegenüberstellung der theoretischen und gemessenen Gefrierpunkts-
erniedrigung ΔT von NaCl und KCl gelöst in Wasser**

Salz in mval/l	theoret. ΔT in °C	gefundene ΔT in °C	$\Delta^\circ C$
NaCl 100	0,372	0,351	— 0,021
NaCl 200	0,744	0,704	— 0,040
NaCl 300	1,116	1,048	— 0,068
NaCl 400	1,488	1,390	— 0,098
KCl 100	0,372	0,360	— 0,012
KCl 200	0,744	0,704	— 0,040
KCl 300	1,116	1,048	— 0,068
KCl 400	1,488	1,388	— 0,100

b) Messung der Leitfähigkeit

Auch die Messung der Leitfähigkeit der reinen Salzlösungen ergibt bei höheren Konzentrationen eine Abweichung von den theoretisch zu erwartenden Werten (Tabelle 2). Diese wurden berechnet nach der Debye-Hückel-Onsager-Gleichung (Pru tton 9) (s. unter D 2).

**Tab. 2: Gegenüberstellung der theoretischen und gemessenen Leitfähigkeit LF
bei 37° C von NaCl und KCl gelöst in Wasser**

Salz in mval/l	theoret. LF in Ω^{-1}	gefundene LF in Ω^{-1}
NaCl 100	0,0125	0,01253
NaCl 200	0,0222	0,02348
NaCl 300	0,0300	0,03419
NaCl 400	0,0363	0,04345
KCl 100	0,0156	0,01529
KCl 200	0,02844	0,02853
KCl 300	0,03948	0,04227
KCl 400	0,04907	0,05535

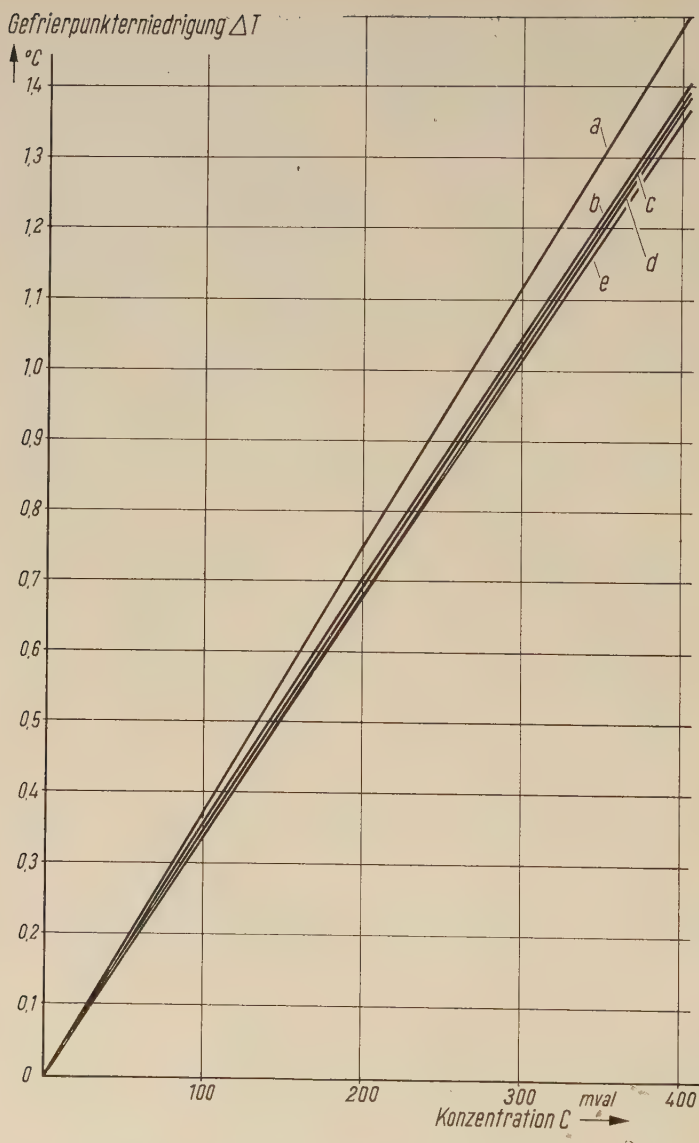


Abb. 1: Gefrierpunkterniedrigung ΔT in $^{\circ}\text{C}$ von:

- a = KCl in Wasser theoretisch = NaCl in Wasser theoretisch
- b = KCl in Wasser gemessen = NaCl in Wasser = NaCl in HA
- c = KCl in HA von 0,1 g%
- d = KCl in HA 0,25 g%
- e = KCl in HA 0,5 g%

2. Salze in Humanalbuminlösungen

a) Messung der Gefrierpunktserniedrigung

Die Gefrierpunktserniedrigung wurde gemessen bei Humanalbuminkonzentrationen von 0,1; 0,25; 0,5 g⁰/. Die Gefrierpunktserniedrigung reiner Albuminlösungen dieser Konzentrationen liegt im Bereich der Fehlergrenze der Methode und kann daher in ihrer Abweichung von Null nicht bestimmt werden, ist aber deshalb jedenfalls zu vernachlässigen. Nach Zusatz von 100, 200, 300, 400 mval NaCl bzw. KCl beobachtet man die von der reinen Salzlösung bekannte proportionale Abhängigkeit der Gefrierpunktserniedrigung von der Salzkonzentration. Die Lösungen mit NaCl zeigen dabei keine Abweichung der Werte von denjenigen der reinen Salzlösung. Die Lösungen mit KCl dagegen ergeben eine deutliche Verringerung der Gefrierpunktserniedrigung gegenüber der reinen Salzlösung (Tabelle 3). Die Verringerung wird mit steigender Albuminkonzentration größer.

Tab. 3: Gegenüberstellung der Gefrierpunktserniedrigung von NaCl und KCl gelöst in Humanalbuminlösungen verschiedener Konzentrationen

Hierzu Abbildung 1

Salz in mval/l	ΔT °C bei HA 0,1 g%	Δ	ΔT °C bei HA 0,25 g%	Δ	ΔT °C bei HA 0,5 g%	Δ
NaCl 100	0,365	+0,014	0,357	+0,006	0,357	+0,006
NaCl 200	0,707	+0,003	0,707	+0,003	0,708	+0,004
NaCl 300	1,065	+0,007	1,047	—0,001	1,045	—0,003
NaCl 400	1,393	+0,003	1,398	+0,008	1,399	+0,009
KCl 100	0,354	—0,006	0,347	—0,013	0,344	—0,016
KCl 200	0,690	—0,014	0,694	—0,010	0,696	—0,008
KCl 300	1,030	—0,018	1,026	—0,022	1,022	—0,026
KCl 400	1,376	—0,012	1,364	—0,024	1,352	—0,036

Δ ist bezogen auf die Werte der gemessenen reinen Salzlösungen.

Die Fehlergrenze ist 0,008.

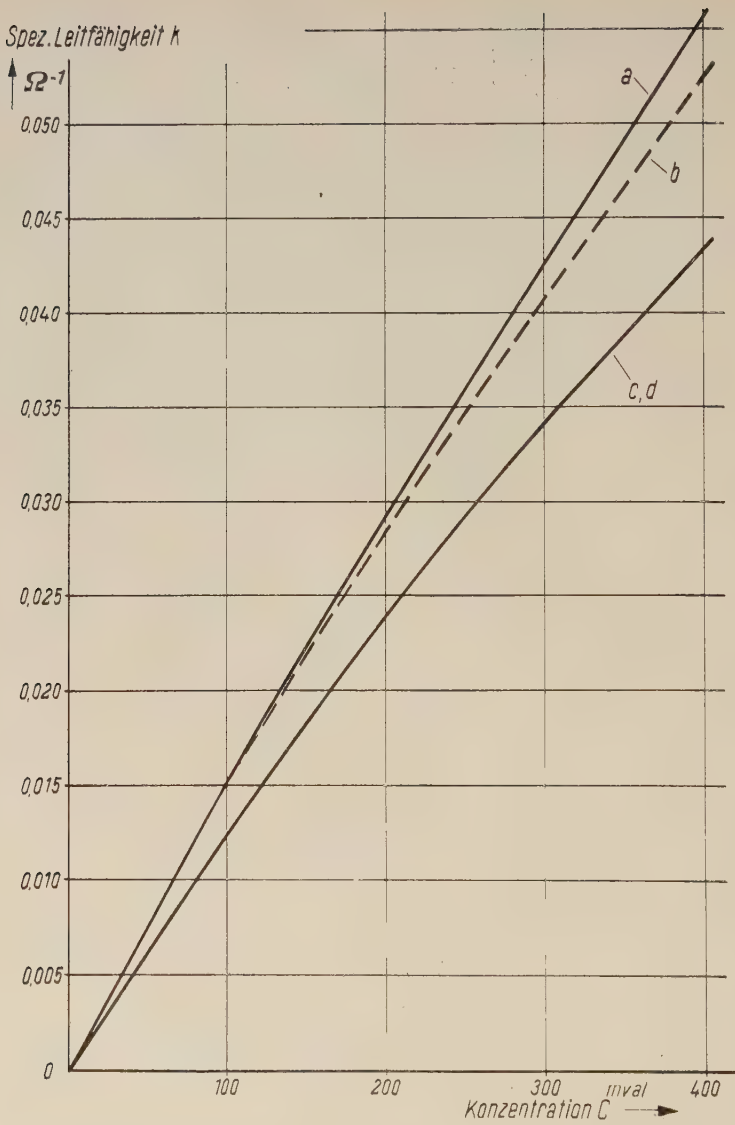


Abb. 2: Spezifische Leitfähigkeit k in Ω^{-1} von:

- a = KCl in Wasser gelöst
- b = KCl in HA von 0,5 g%
- c = NaCl in Wasser gelöst
- d = NaCl in HA von 0,5 g%

b) Messung der Leitfähigkeit

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gefrierpunktserniedrigung findet man auch bei der Leitfähigkeitsmessung bei Humanalbuminlösungen und NaCl keine Abweichung der Meßwerte von der reinen Salzlösung, dagegen bei Humanalbuminlösungen plus KCl eine deutliche Abweichung im Sinne einer Erhöhung des spezifischen Widerstandes bzw. einer Abnahme der Leitfähigkeit nach Eiweißzusatz (Tabelle 4). Diese Messungen wurden nur für 0,5 g% Humanalbumin durchgeführt.

**Tab. 4: Gegenüberstellung der Leitfähigkeit von NaCl und KCl
gelöst in Wasser und 0,5 g% Humanalbumin, gemessen nach 24 Std.**

Hierzu Abbildung 2

Salz in mval/l	LF in H ₂ O Ω -1	LF in 0,5 g% HA nach 24 h Ω -1	Δ
NaCl 100	0,01253	0,01253	—
NaCl 200	0,02348	0,02360	+ 0,00012
NaCl 300	0,03419	0,03419	—
NaCl 400	0,04345	0,04345	—
KCl 100	0,01529	0,01529	—
KCl 200	0,02853	0,02785	— 0,00068
KCl 300	0,04227	0,04079	— 0,00148
KCl 400	0,05535	0,05224	— 0,00311

c) Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom Alter der Lösungen

Da sich eine zeitliche Abhängigkeit der Messungen ergab, wurden die Leitfähigkeitsmessungen für verschiedene Zeiten nach der Herstellung der Lösungen wiederholt (Tabelle 5). Dabei wurde festgestellt, daß mit zunehmendem Alter der Lösungen die Abweichung der Leitfähigkeit von der reinen Salzlösung größer wurde (Abbildung 3 und 4). Das gilt auch für Humanalbuminlösungen und NaCl. Das bedeutet, daß ein Teil der Kaliumionen in Gegenwart von Humanalbumin von Anfang an osmotisch unwirksam ist, während Natriumionen erst nach längerer Zeit inaktiviert werden. Die Inaktivierung der Kaliumionen ist jedoch zu jeder Zeit größer als die der Natriumionen.

Spez. Leitfähigkeit k

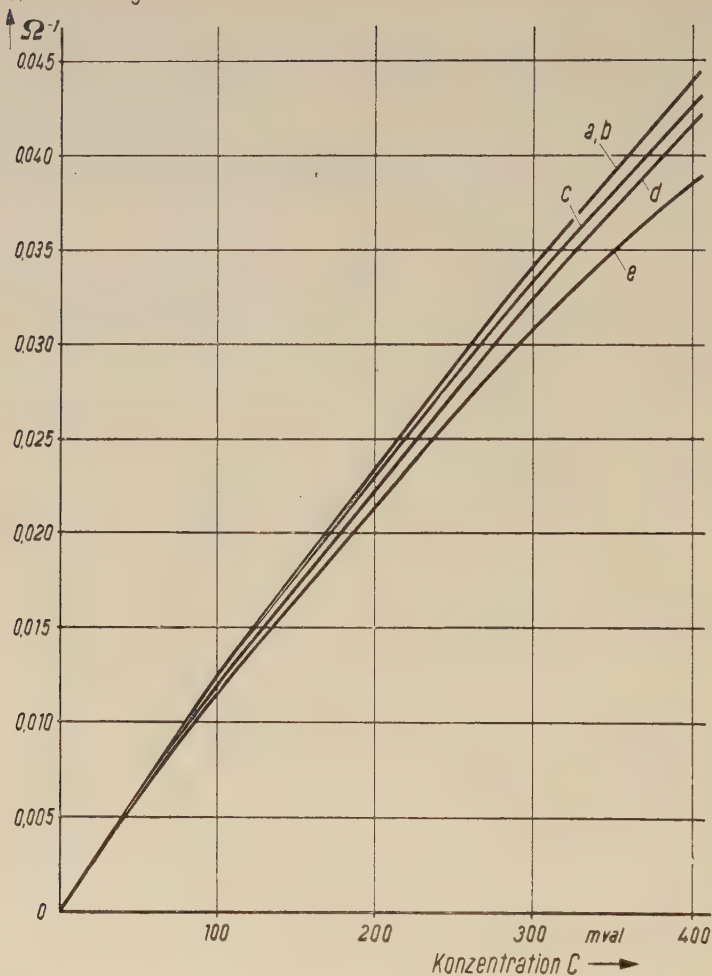


Abb. 3: Spezifische Leitfähigkeit k in Ω^{-1} von:

- a = NaCl in Wasser gelöst
- b = NaCl in 0,5 g% HA gelöst nach 1 Std.
- c = NaCl in 0,5 g% HA gelöst nach 48 Std.
- d = NaCl in 0,5 g% HA gelöst nach 96 Std.
- e = NaCl in 0,5 g% HA gelöst nach 144 Std.

Spez. Leitfähigkeit k

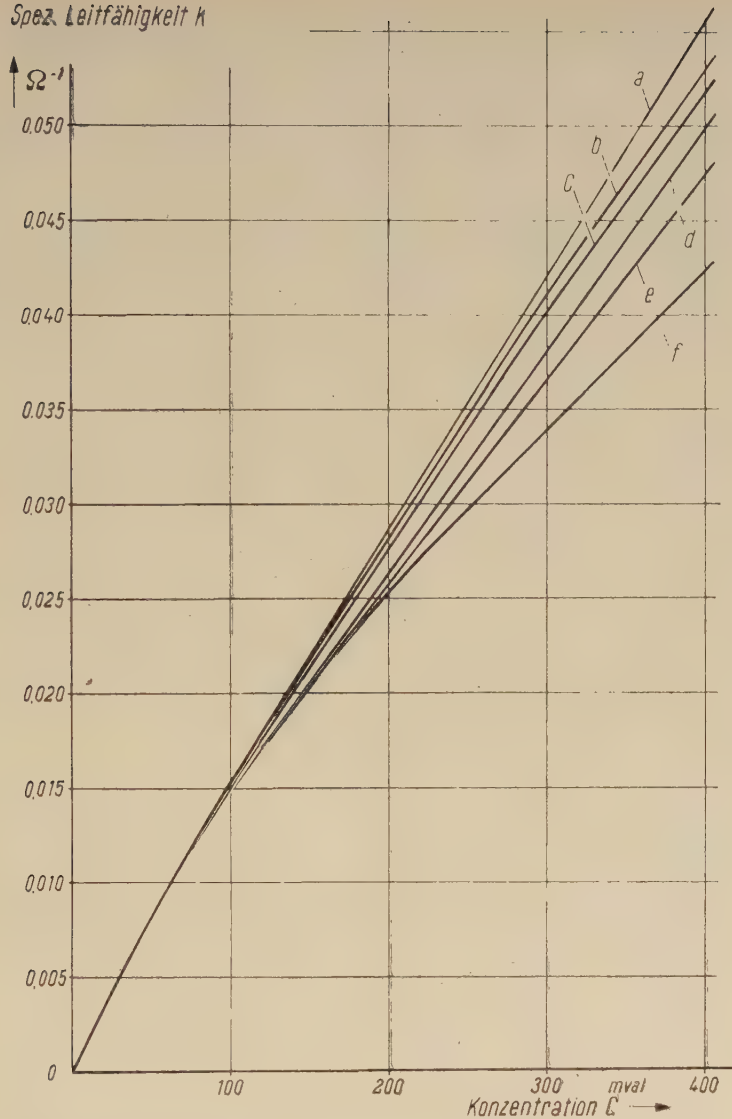


Abb. 4: Spezifische Leitfähigkeit k in Ω^{-1} in:

- a = KCl in Wasser gelöst
- b = KCl in 0,5 g% HA gelöst nach 1 Std.
- c = KCl in 0,5 g% HA gelöst nach 48 Std.
- d = KCl in 0,5 g% HA gelöst nach 96 Std.
- e = KCl in 0,5 g% HA gelöst nach 120 Std.
- f = KCl in 0,5 g% HA gelöst nach 144 Std.

Tab. 5: Abhängigkeit der Leitfähigkeit von NaCl und KCl in 0,5 g% Humanalbuminlösungen von dem Alter der Lösungen

Salz in mval/l	Leitfähigkeit in Ω^{-1} nach:						
	1 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.	120 Std.	144 Std.
NaCl 100	0,01253	0,01253	0,01256	0,01236	0,01198	0,01223	0,01171
NaCl 200	0,02360	0,02360	0,02313	0,02267	0,02214	0,02214	0,02113
NaCl 300	0,03419	0,03419	0,03369	0,03321	0,03251	0,03100	0,03039
NaCl 400	0,04428	0,04345	0,04266	0,04189	0,04151	0,03974	0,03842
KCl 100	0,01529	0,01529	0,01529	0,01495	0,01495	0,01504	0,01534
KCl 200	0,02801	0,02785	0,02767	0,02703	0,02612	0,02569	0,02620
KCl 300	0,04115	0,04079	0,04008	0,03975	0,03811	0,03549	0,03369
KCl 400	0,05284	0,05224	0,05166	0,05109	0,05000	0,04744	0,04227

d) Abhängigkeit der Gefrierpunktserniedrigung vom pH der Lösungen

Die gemessenen Albuminlösungen zeigten alle einen pH von 5,7 bis 5,8. Bei den folgenden Messungen wurden die 0,1 g% Albuminlösungen mit n/10 HCl auf pH 3 und pH 2 angesäuert (Tabelle 6) und mit n/10 NaOH auf pH 10 gebracht. Zur Kontrolle wurden erst reine angesäuerte und alkalische Salzlösungen gemessen. Wie zu erwarten, liegen die Meßwerte niedriger als die theoretischen Werte, was auf einen Konzentrationseffekt zurückzuführen ist (siehe unter C 1 a).

Mißt man die auf pH 2 angesäuerten Humanalbuminlösungen nach Zusatz von 100, 200, 300 und 400 mval NaCl und KCl, so zeigt sich gegenüber den reinen angesäuerten Salzlösungen keine Veränderung. Das gilt sowohl für NaCl als auch für KCl (Tabelle 6). Das bedeutet, daß der oben für pH 5,8 beschriebene Unterschied zwischen Na^+ und K^+ im osmotischen Verhalten gegenüber Proteinlösungen aufgehoben ist.

Die gleiche Beobachtung wird bei Lösungen von pH 3 gemacht.

Tab. 6: Vergleich der Gefrierpunktserniedrigung von NaCl und KCl in 0,1 g% Humanalbuminlösungen bei pH 2

Salz in mval/l	ΔT in $^{\circ}\text{C}$	Salz in mval/l	ΔT in $^{\circ}\text{C}$
NaCl 100	0,384	KCl 100	0,385
NaCl 200	0,738	KCl 200	0,740
NaCl 300	1,087	KCl 300	1,084
NaCl 400	1,438	KCl 400	1,430

Bei den alkalischen Albuminlösungen besteht jedoch ein Unterschied in der Osmolarität von aequimolaren Na^+ - und K^+ -Lösungen von der gleichen Größenordnung, wie er bei pH 5,8 für den Einfluß von Proteinlösungen auf die osmotische Aktivität der Kaliumionen beschrieben wurde.

3. Salze in Pseudoglobulinlösungen

Um festzustellen, ob die osmotische Inaktivierung eines Teils der Kaliumionen eine allgemeine Eigenschaft der Eiweiße ist, wurden die gleichen Messungen wie in Albuminlösungen bei in Pseudoglobulin gelösten NaCl und KCl gleicher Mengen wiederholt. Es ergab sich dabei eine Übereinstimmung der Meßwerte von Elektrolyt plus Pseudoglobulinlösungen mit den in elektrolytfreiem Wasser gelösten Salzen, also kein Unterschied zwischen der Osmolarität von NaCl und KCl in Anwesenheit von Pseudoglobulinen (Tabelle 7, 8). Die Ergebnisse von Kryoskopie und Leitfähigkeitsmessung stimmen im Bereich der Fehlergrenze überein.

Tab. 7: Gegenüberstellung der Gefrierpunktserniedrigung von reinen Salzlösungen und Salz in 0,5 g% Pseudoglobulinlösungen

Salz in mval/l	reine Salzlösung ΔT in $^{\circ}\text{C}$	Pseudo- globulinlösung ΔT in $^{\circ}\text{C}$	Δ
NaCl 100	0,351	0,358	+ 0,007
NaCl 200	0,704	0,713	+ 0,009
NaCl 300	1,048	1,050	+ 0,002
NaCl 400	1,390	1,389	— 0,001
KCl 100	0,360	0,359	— 0,001
KCl 200	0,704	0,701	— 0,003
KCl 300	1,048	1,053	+ 0,005
KCl 400	1,388	1,391	+ 0,003

Tab. 8: Gegenüberstellung der Leitfähigkeit LF von reinen Salzlösungen und Salz in 0,5 g% Pseudoglobulinlösungen

Salz in mval/l	reine Salzlösung LF in Ω^{-1}	Pseudo- globulinlösung LF in Ω^{-1}	Δ
NaCl 100	0,01235	0,01192	— 0,00061
NaCl 200	0,02348	0,02348	—
NaCl 300	0,03419	0,03419	—
NaCl 400	0,04345	0,04345	—
KCl 100	0,01529	0,01503	— 0,00026
KCl 200	0,02853	0,02818	— 0,00035
KCl 300	0,04227	0,04151	— 0,00076
KCl 400	0,05535	0,05406	— 0,00129

Der Unterschied der Leitfähigkeit der KCl-Lösungen läßt einen Gang erkennen. Da durch die Berechnung (siehe unter D 2) der Fehler mit steigender Konzentration größer wird und der Anstieg kleiner als die dreifache Fehlerbreite ist, kann er nicht als signifikant angesehen werden.

4. Salze in Rinderalbuminlösungen

Um zu untersuchen, ob die Albumine verschiedener Spezies sich auf die osmotische Inaktivierung von Kaliumionen gleich verhalten, wiederholten wir die Messungen in Rinderalbuminlösungen. Es ergab sich hier eine Verringerung der Osmolarität von Kalium wie beim Humanalbumin. Das in Rinderalbuminlösung gelöste NaCl zeigte keine Veränderung im osmotischen Verhalten gegenüber dem in elektrolytffreiem Wasser gelösten. Die Ergebnisse der Gefrierpunktmessung und der Leitfähigkeitsbestimmung stimmen im Bereich der Fehlergrenze überein.

Tab. 9: Gegenüberstellung der Gefrierpunktserniedrigung von reinen Salzlösungen und Salz in 0,5 g% Rinderalbuminlösungen

Salz in mval/l	reine Salzlösung ΔT in $^{\circ}C$	Rinder- albuminlösung ΔT in $^{\circ}C$	Δ
NaCl 100	0,351	0,357	+ 0,006
NaCl 200	0,704	0,700	— 0,004
NaCl 300	1,048	1,056	+ 0,008
NaCl 400	1,390	1,397	+ 0,007
KCl 100	0,360	0,347	— 0,013
KCl 200	0,704	0,698	— 0,006
KCl 300	1,048	1,028	— 0,020
KCl 400	1,388	1,354	— 0,034

Tab. 10: Gegenüberstellung der Leitfähigkeit von reinen Salzlösungen und Salz in 0,5 g% Rinderalbuminlösungen

Salz in mval/l	reine Salzlösung LF in Ω^{-1}	Rinder- albuminlösung LF in Ω^{-1}	Δ
NaCl 100	0,01235	0,01192	— 0,00061
NaCl 200	0,02348	0,02360	— 0,00012
NaCl 300	0,03419	0,03419	—
NaCl 400	0,04345	0,04387	+ 0,00042
KCl 100	0,01529	0,01481	— 0,00048
KCl 200	0,02853	0,02767	— 0,00086
KCl 300	0,04227	0,04008	— 0,00219
KCl 400	0,05535	0,05224	— 0,00311

5. Salze in Pferdealbuminlösungen

In Pferdealbuminlösung gelöstes NaCl und KCl war osmotisch gleich wirksam (Tabelle 10, 11). Die Inaktivierung eines Teils der Kaliumionen, die bei Humanalbumin beobachtet wurde, konnte hier nicht gemessen werden. Die Ergebnisse beider Meßmethoden stimmen überein. Auch hier ist für die Unterschiede bei der Leitfähigkeitsmessung ein Gang erkennbar (siehe unter C 3).

Tab. 11: Gegenüberstellung der Gefrierpunktserniedrigung von reinen Salzlösungen und Salz in 0,5 g⁰/o Pferdealbuminlösungen

Salz in mval/l	reine Salzlösung ΔT in °C	Pferde- albuminlösung ΔT in °C	Δ
NaCl 100	0,351	0,354	+ 0,003
NaCl 200	0,704	0,712	+ 0,008
NaCl 300	1,048	1,054	+ 0,006
NaCl 400	1,390	1,397	+ 0,007
KCl 100	0,360	0,353	— 0,007
KCl 200	0,704	0,713	+ 0,009
KCl 300	1,048	1,049	+ 0,001
KCl 400	1,388	1,392	+ 0,004

Tab. 12: Gegenüberstellung der Leitfähigkeit von reinen Salzlösungen und Salz in 0,5 g⁰/o Pferdealbuminlösungen

Salz in mval/l	reine Salzlösung LF in Ω^{-1}	Pferde- albuminlösung LF in Ω^{-1}	Δ
NaCl 100	0,01253	0,01260	+ 0,00007
NaCl 200	0,02348	0,02348	—
NaCl 300	0,03419	0,03394	— 0,00025
NaCl 400	0,04345	0,04266	— 0,00079
KCl 100	0,01529	0,01503	— 0,00026
KCl 200	0,02853	0,02818	— 0,00035
KCl 300	0,04227	0,04189	— 0,00038
KCl 400	0,05535	0,05406	— 0,00129

D. Auswertung der Meßergebnisse

Für Humanalbumin und Rinderalbuminlösungen mit KCl wurde durch unsere Untersuchungen sowohl mit der Methode der Kryoskopie als auch der Leitfähigkeitsmessung der Nachweis erbracht, daß Kaliumionen in Gegenwart dieser Albumine osmotisch inaktiviert werden. Die folgende Berechnung soll zeigen, daß die

Übereinstimmung der Meßergebnisse beider Methoden auch quantitativer Art ist. Unter der Annahme, daß Kaliumionen durch die Albuminmoleküle gebunden werden, wird hierzu die pro Molekül gebundene Anzahl von Kaliumionen berechnet.

1. Gefrierpunktserniedrigung von 0,5 g% Humanalbumin + 400 mval KCl

Für diese Lösung wurde ein Unterschied der Gefrierpunktserniedrigung zwischen der reinen KCl-Lösung und der KCl-Lösung plus Humanalbumin von 0,036 °C gefunden. Nach der Gleichung

$$\Delta T = 1,86 \cdot C$$

entspricht das einer Konzentration von

$$0,036 : 1,86 = C = 0,019 \text{ mol/liter}$$

Pro Liter sind demnach 19 mmol Kaliumionen vom Albumin osmotisch inaktiv gebunden.

$$1 \text{ Mol K}^+ = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ K}^+;$$

$$19 \text{ mmol K}^+ = 11,44 \cdot 10^{21} \text{ K}^+;$$

Legt man für Humanalbumin ein Molekulargewicht von 69.000 zugrunde, dann enthält eine 0,5 g% Humanalbuminlösung $0,0436 \cdot 10^{21}$ Moleküle.

Die pro Albuminmolekül gebundene Anzahl von K^+ errechnet sich zu

$$\frac{11,44 \cdot 10^{21}}{0,043 \cdot 10^{21}} = 263 \text{ K}^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$$

2. Leitfähigkeit von 0,5 g% Humanalbumin + 400 mval KCl

Bei der Leitfähigkeitsmessung wurde bei dieser Lösung eine Verringerung der Leitfähigkeit von $0,00310 \Omega^{-1}$ gegenüber der reinen KCl-Lösung gefunden. Wie bei der Kryoskopie wird auch hier die diesem Wert entsprechende Menge der gebundenen Kaliumionen aus der theoretischen Gleichung für die Abhängigkeit der Leitfähigkeit Λ von der Konzentration berechnet. Diese Gleichung ist die Debye-Hückel-Onsager-Gleichung (Prutton, 9):

$$\Lambda = \Lambda_0 - \left[\frac{0,9834 \times 10^6}{(DT)^{3/2}} \times \omega \Lambda_0 + \frac{28,94 (Z_+ + Z_-)}{\eta (DT)^{1/2}} \right] \sqrt{(Z_+ + Z_-)C};$$

$$\text{wobei } \omega = \frac{z_+ \times z_- \times (2q)}{1/q}$$

$$\text{und } q = \frac{z_+ \times z_- \cdot \Lambda_0}{(z_+ + z_-) \times (z_+ l_+^0 + z_- l_-^0)} \text{ ist.}$$

D = Dielektrizitätskonstante = 78,55

T = absolute Temperatur

z = Ladung des Ions

C = Konzentration

l = Äquivalentionenleitfähigkeit

Λ_0 = Äquivalentleitfähigkeit

η = Viskosität des Lösungsmittels, für H₂O bei 37 °C = 0,007.

Da die Leitfähigkeitsmessung bei 37° C durchgeführt wurde, und die Leitfähigkeit von der Temperatur abhängig ist nach der Gleichung:

$$\Lambda_0(t) = \Lambda_0(25^\circ) \times [1 + \beta \times (t - 25)]$$

wird der aus der Tabelle (P r u t t o n) entnommene Wert für $\Lambda_0(25^\circ)$ auf den für $\Lambda_0(37^\circ)$ umgerechnet:

$$\Lambda_0(25^\circ) \text{ für KCl} = 149,86;$$

β ist eine Konstante, die für Salze den Wert von 0,22 hat.

$$\begin{aligned}\Lambda_0(37^\circ) &= 149,86 \times 1 + 0,22 \times (37-25); \\ &= 189,42;\end{aligned}$$

Mit diesem $\Lambda_0(37^\circ)$ Wert bekommt man aus der Debye-Hückel-Onsager-Gleichung die Abhängigkeit von der Konzentration C:

$$\Lambda = 189,42 - 74,63 \sqrt{2C};$$

Aus dieser Gleichung wurden einige Werte von Λ bei verschiedenen Konzentrationen ausgerechnet und für diese Werte nach der Gleichung:

$$\Lambda = \frac{k \times 1000}{C}$$

die entsprechenden Werte für die spezifische Leitfähigkeit bestimmt.

$$\Lambda_0 = 189,42$$

$$\Lambda_{0,025} = 172,73; \quad k = 0,0042$$

$$\Lambda_{0,05} = 165,82; \quad k = 0,0083$$

$$\Lambda_{0,1} = 156,05; \quad k = 0,01560$$

$$\Lambda_{0,2} = 142,22; \quad k = 0,02844$$

$$\Lambda_{0,3} = 131,67; \quad k = 0,039483$$

$$\Lambda_{0,4} = 122,67; \quad k = 0,049068$$

Aus diesen Werten kann die Kurve für die Abhängigkeit der spezifischen Leitfähigkeit k von der Konzentration C gezeichnet werden (Abbildung 5). Der Unterschied der Leitfähigkeit zwischen der reinen Salzlösung und der 0,5 g% Humanalbuminlösung + 400 mval KCl beträgt 0,0031 Ω^{-1} . Diese Differenz entspricht der Konzentration an Kaliumionen, die durch Albumin gebunden wur-

Spez. Leitfähigkeit k

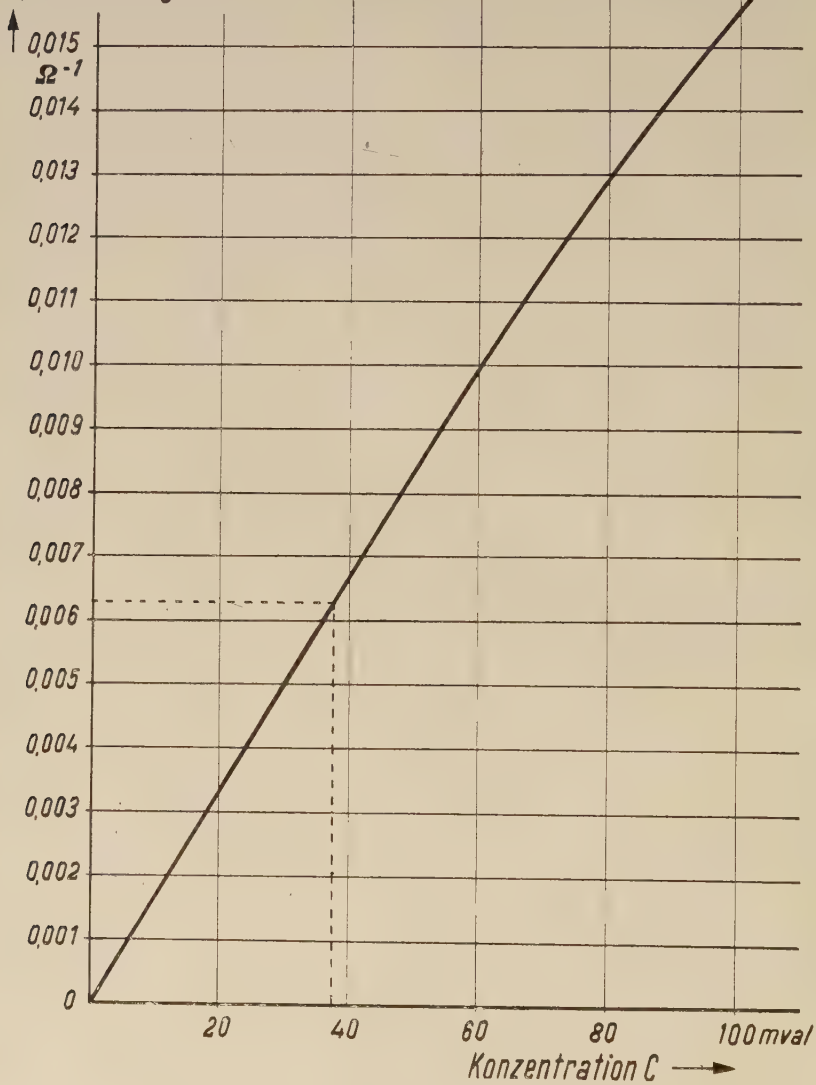


Abb. 5: Zur Berechnung der osmotisch inaktivierten Kaliumionen

den. Wenn man aus der gezeichneten Kurve, die für KCl gilt, den entsprechenden Kaliumanteil entnehmen will, muß man berücksichtigen, daß K^+ eine Äquivalentenleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung von $73,52 \Omega^{-1}$ Cl- dagegen von $76,34 \Omega^{-1}$ hat. Das heißt, daß die der gefundenen K^+ Konzentra-

tion entsprechende KCl-Lösung eine Leitfähigkeit von $0,0063 \Omega^{-1}$ haben müßte. Aus der gezeichneten Kurve entnimmt man für diesen Wert eine Konzentration von 38 mmol/l. Da die Äquivalentenleitfähigkeit von K^+ nur 49% gegenüber Cl^- 51% bei KCl ausmacht, entsprechen auch nur 49 Prozent von den 38 mmol dem gebundenen K^+ , das sind 18,6 mmol/l.

$$18,6 \text{ mmol } K^+ = 11,2 \times 10^{21} K^+.$$

Pro Albumin sind demnach gebunden:

$$\frac{11,2 \times 10^{21}}{0,0436 \times 10^{21}} = 256 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}.$$

Es zeigt sich, daß die Auswertung beider Meßmethoden praktisch zu den gleichen Ergebnissen führt:

Gefrierpunktserniedrigung: $263 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$

Leitfähigkeit: $256 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$

bei einer 0,5 g% Humanalbuminlösung + 400 mval KCl.

Für 0,5 g% Humanalbuminlösung + 200 mval KCl ergibt sich nach diesem Berechnungsverfahren:

Gefrierpunktserniedrigung: $60 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$

Leitfähigkeit: $58 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$

und für 0,5 g% Humanalbuminlösung + 300 mval KCl

Gefrierpunktserniedrigung: $196 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$

Leitfähigkeit: $124 K^+ / \text{Humanalbuminmolekül}$.

Daraus kann gefolgert werden, daß die gefundene osmotische Inaktivierung von Kaliumionen durch Humanalbumin kein durch die Methode verursachtes Zufallsergebnis ist, sondern eine reale Ursache haben muß.

E. Diskussion

Die in Abschnitt C 1. beschriebenen Messungen der Gefrierpunktserniedrigung und Leitfähigkeit reiner Salzlösungen sollten zeigen, inwieweit die Meßmethoden für den gewählten Konzentrationsbereich geeignet sind. Es war zu erwarten, daß in wässrigen Lösungen starker Elektrolyte bei Konzentrationen über 100 mval zunehmende Abweichungen von den theoretischen Werten auftreten (Prutton 9). Dem entsprechen unsere Meßergebnisse. Das bedeutet, daß bei der Betrachtung unserer Ergebnisse ein Konzentrationsfehler in Rechnung gesetzt werden muß. Dieser Fehler spielt aber keine Rolle, wenn man, wie in dieser Arbeit, nur die Unterschiede der Gefrierpunktserniedrigung und Leitfähigkeit zwischen Natrium und Kalium betrachtet.

In Abschnitt C 2. der Messungen wurde das osmotische Verhalten von Natrium- und Kaliumionen in Humanalbuminlösungen miteinander verglichen. Dabei wurde folgendes festgestellt:

1. Kalium zeigt bei allen gemessenen Humanalbumin-Konzentrationen geringere Gefrierpunktserniedrigung und Leitfähigkeit als Kalium in reiner Salzlösung und Natrium der gleichen Konzentration. Na^+ ergibt dagegen in Humanalbumin gelöst die gleiche Gefrierpunktserniedrigung und Leitfähigkeit wie in Wasser gelöst.
2. Der Unterschied in der osmotischen Aktivität von Na^+ und K^+ in Humanalbumin nimmt mit steigender Humanalbumin-Konzentration zu.
3. Gefrierpunktserniedrigung und Leitfähigkeit nehmen mit zunehmendem Alter der Albuminlösungen ab.
4. Die Veränderung der Gefrierpunktserniedrigung durch Albuminzusatz hängt vom pH der Lösungen ab, und zwar ist der osmotische Unterschied zwischen Na^+ und K^+ im stark sauren Bereich aufgehoben, während er zwischen pH 5,7 bis 10,0 unverändert weiterbesteht.

Durch diese Ergebnisse ist bewiesen, daß Humanalbumin in vitro Kalium binden und damit osmotisch unwirksam machen kann. Bekräftigt wird dieser Beweis durch die quantitative Übereinstimmung beider angewandter Methoden, wie sie die stöchiometrische Durchrechnung zeigt.

Da in den vorliegenden Versuchen die Bedingungen so gewählt wurden, daß sie hinsichtlich der Elektrolyt-Konzentrationen denen in der Zelle vergleichbar sind, kommen wir zu dem Schluß, daß auch in der Zelle Kaliumionen durch die Zelleiweiße gebunden werden können. Einige beobachtete Eigenschaften der Zelle wären auf diese Weise zu erklären. Es wurde z. B. schon lange postuliert, daß die Zelle die Möglichkeit haben müsse, relativ kleinmolekulare Substanzen zu speichern, ohne den osmotischen Druck zu erhöhen (Rein 10, L a r a g h 11). Die Vermutung, daß dies durch den Aufbau größerer Molekel möglich sein müßte, kann man dahin konkretisieren, daß neben dem für die osmotischen Eigenschaften der Zelle verantwortlichen, gelösten freien Kalium größere Mengen dieses Ions an Albumin gebunden gespeichert werden können.

Welt, Orloff, Kydd und Oltmann (4) fanden z. B. beim Elektroschock eine celluläre Hyperosmolarität. Sie konnten durch Zunahme der Natrium-Konzentration im extracellulären Raum wahrscheinlich machen, daß, ausgelöst durch eine schnelle Konzentrationserhöhung in der Zelle, eine Wasserbewegung in die Zelle eintritt. Sie vermuten, daß unter den Bedingungen des Schocks in den Zellen große Moleküle in eine größere Zahl kleinerer zerfallen. Sie fanden auch, daß größere Mengen Kalium frei werden, zu Beginn des Schocks aus der Zelle austreten und im Laufe der Erholung in die Zelle zurückkehren. Diese Befunde können ebenfalls damit in Übereinstimmung stehen, daß das an Albumin gebundene Kalium unter den Bedingungen des Schocks frei wird (Leonhard und Harrison 12).

Damit erhebt sich auch die Frage nach der Art der Bindung der Kaliumionen an Humanalbumin.

Da im Humanalbumin der Anteil an Aminosäuren mit freien Carboxylgruppen groß ist (10,4% Asparaginsäure, 17,4% Glutaminsäure) (T r i s t r a m 13), liegt die Vermutung nahe, daß an diesen freien anionischen Gruppen eine Bindung erfolgt. Daß eine solche Bindung für Alkalimetallionen zu diskutieren ist, zeigen die osmotischen und kryoskopischen Messungen in wässrigen Lösungen polyacrylsaurer Salze. Es wurde dabei festgestellt, daß diese polyvalenten Anionen eine starke Inaktivierung ihrer Gegenionen bewirken (K e r n 14). Bei den polyacrylsaurer Salzen wurde das für Natriumionen bewiesen. Sollte auch im Humanalbumin die Bindung an der Carboxylgruppe erfolgen, so ist eine Selektivität in Bezug auf Kaliumionen schwer zu erklären. Gegen diese Bindungsmöglichkeit spricht auch, daß im Pferdealbumin, das eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie das Humanalbumin hat, weder Natrium noch Kalium osmotisch inaktiviert werden.

Ein weiterer Hinweis, in welcher Weise Kalium an Eiweiß gebunden sein kann, ist die Tatsache, daß zum Aufbau von Muskelprotein Kalium notwendig ist und fest in die Struktur des Proteins eingebaut wird (L a r a g h 11, L e o n h a r d und H a r r i s o n 12, T a n n h ä u s e r 15). C a n n o n, F r a z i e r, H u g h e s (16) konnten in Fastenversuchen an Ratten nachweisen, daß das Verhältnis von im Urin ausgeschiedenem Kalium zu Stickstoff einen konstanten Wert von 1 : 10 erreicht. Dieser Wert entspricht dem Verhältnis, wie es im Muskelprotein vorliegt. Daraus schlossen sie, daß während des Fastens ein ständiger Kaliumverlust auftritt, der von dem graduellen Abbau des cellulären Protoplasma im endogenen Stoffwechsel abhängt.

Bei dem erwähnten Schockversuch von W e l t, O r l o f f, K y d d und O l t m a n n (4) wäre es denkbar, daß unter den Bedingungen des Schocks die Albuminmoleküle so stark entfaltet werden, daß das in die Struktur eingebaute Kalium frei wird. Das von uns gebunden nachgewiesene Kalium kann jedoch nicht diesem fest eingebauten Kalium gleichgesetzt werden. Wie das konstante Zahlenverhältnis 1 : 10 für Kalium : Stickstoff, das aus dem Proteinabbau stammt, zeigt, benötigt jedes dieser Proteinmoleküle eine bestimmte und konstante Zahl von Kaliumionen zum Aufbau. Dagegen konnten wir nachweisen, daß die durch Humanalbumin gebundene Menge Kalium von der Konzentration abhängt, woraus man auf ein Gleichgewicht zwischen den freien Komponenten Kalium und Albumin und dem „Komplex“ schließen kann.

N e u n h ö f f e r und K a b o t (6) vermuten auf Grund ihrer Untersuchungen des osmotischen Verhaltens von Kalium in Humanalbumin, daß die Bindung an der Peptidbindung erfolgt, da sie durch ihre Berechnungen festgestellt haben, daß pro Peptidbindung bis zu 1 Kaliumion inaktiviert wird. Die von ihnen veröffentlichten Werte stimmen mit unseren Ergebnissen quantitativ nicht überein. Sie finden einen größeren Unterschied der Gefrierpunktserniedrigung zwischen Natrium und Kalium. Es fällt auf, daß N e u n h ö f f e r und K a b o t für eine 0,5 n NaCl-Lösung eine Gefrierpunktserniedrigung von 1,94 °C gegenüber reinem Wasser finden, während der theoretische Wert für diese Lösung 1,86 °C wäre. In diesem Konzentrationsbereich haben wir eine

geringere als die theoretische Depression gefunden, die wir dadurch erklären, daß wir an Stelle von Aktivitäten Konzentrationen eingesetzt haben (siehe Abschnitt C 1. a). Eine größere Depression als die theoretische, wie sie bei Neunhöffer und Kabot vorliegt, ist physiochemisch nicht erklärlich. Sollte sich dieser Wert nur auf die Eiweißlösungen nach Salzzusatz beziehen, wäre eine Erklärung dadurch gegeben, daß das von ihnen verwendete Humanalbumin nicht elektrolytfrei war. Wir fanden nämlich, daß das von uns benutzte Humanalbumin vor der Dialyse Elektrolytmengen enthielt, die größenordnungsmäßig dem Unterschied zwischen Neunhöffers und Kabots sowie unseren Messungen entsprechen würden. So wäre auch die größere Differenz der Depression zwischen Na^+ und K^+ zu erklären, da im nicht vorbehandelten Albumin auch K^+ gefunden wurde, das die konzentrationsabhängige Kaliuminaktivierung durch Humanalbumin beeinflußt haben könnte.

Die von uns gefundene geringere Differenz der Gefrierpunktserniedrigung zwischen Na^+ und K^+ in Humanalbumin bedeutet, daß weniger Kaliumionen pro Albuminmolekül gebunden wurden, als Peptidbindungen vorhanden sind. Das schließt allerdings nicht aus, daß Kalium an den Peptidbindungen gebunden ist. Die Peptidbindungen allein können das Kalium aber wohl nicht binden, da wir gefunden haben, daß Pseudoglobulin vom Menschen und in Übereinstimmung mit Neunhöffer und Kabot auch Pferdealbumin Kaliumionen nicht inaktivieren können, obwohl im Pferdealbumin nicht nur wie im Humanalbumin Peptidbindungen auftreten, sondern auch die Aminosäurezusammensetzung (Wuhrmann und Wunderly, 17) etwa die gleiche ist.

Bei der weiteren Betrachtung über die Art der Bindung von Kaliumionen an Humanalbumin ist zu überlegen, welche Unterschiede zwischen dem Kaliumion und dem Natriumion bestehen, da Natrium in keinem der untersuchten Fälle osmotisch inaktiv gebunden wurde. Der ausschlaggebende Unterschied der beiden Ionen dürfte in ihrer Größe liegen, und zwar ist das Kalium (Radius $1,33 \text{ \AA}$) größer als das Natriumion (Radius $0,95 \text{ \AA}$), (18), so daß die Bindung von Kalium weitgehend vom räumlichen Aufbau des Moleküls abhängen dürfte.

Wie man für einige Fälle nachweisen konnte, beruht die Spezifität einzelner Fermente auf der Größe des Substrats, weil das Protein des Ferments an seiner gefalteten Oberfläche nur Moleküle oder Atomgruppen einer ganz bestimmten Größe binden kann (Schlüsseltheorie). Es scheint uns möglich, daß auch im Falle des Humanalbumins Kalium an einer für die Größe dieses Ions günstig gefalteten Oberfläche adsorbiert wird. Eine Adsorption im Innern des Moleküls wäre zwar denkbar, da etwa 10 Prozent des Molekülvolumens aus Hohlräumen besteht. Diese sind aber kleiner als Wassermoleküle, die daher nicht eingelagert werden können. Deshalb ist eine Anlagerung im Innern des Eiweißmoleküls für Kaliumionen noch unwahrscheinlicher (Putnam, 19). Für eine Anlagerung an der Oberfläche spräche auch unser Befund, daß im sauren Milieu kein Kalium an Humanalbumin gebunden wird, da H^+ -Ionen eine

Denaturierung, das bedeutet auch eine Entfaltung des Albumins, verursachen können.

Im allgemeinen wurde bei Proteinen gefunden, daß eine Denaturierung bei pH-Werten unter 3 und über 10 einsetzt. Im Gegensatz zu der früher vertretenen „Alles-oder-Nichts-Theorie der Denaturierung“ hält man heute einen stufenweisen Übergang vom intakten zum denaturierten Molekül für wahrscheinlich (Putnam 19, Anson 20, Waigh 21). Danach könnten unsere Befunde über den Einfluß des pH so gedeutet werden, daß bei pH 2-3 die Denaturierung des Humanalbumins so weit fortgeschritten ist, daß kein Kalium mehr gebunden werden kann, während bei pH 10 eine geringe Anlagerung noch stattfindet. Ist diese Vorstellung richtig, so kann man annehmen, daß bei der festgestellten Änderung der Humanalbumineigenschaften bei der Alterung der Lösungen weitergehende und anders geartete Veränderungen stattfinden, als beim Ansäuern (Putnam 19). Es wird ja nicht nur mehr Kalium inaktiviert, sondern nach einiger Zeit auch Natrium, und zwar von allen untersuchten Albumin- und Globulinlösungen. Dieser Befund ist sicher nur durch eine Denaturierung zu erklären (siehe auch Kurve 6 und 7).

Ein schlüssiger Beweis für die Art der Bindung des Kaliums an Humanalbumin ist auf Grund unserer Untersuchungen nicht möglich. Die einzelnen Befunde fügen sich aber in die entwickelten Vorstellungen ein.

F. Zusammenfassung

Es wurde das osmotische Verhalten von NaCl und KCl, das wässrig zusammen mit Humanalbumin, Pseudoglobulin, Rinderalbumin und Pferdealbumin gelöst war, kryoskopisch und konduktometrisch gemessen.

Dabei wurde gefunden:

In Humanalbumin wird KCl, nicht dagegen NaCl teilweise osmotisch inaktiviert. Die Durchrechnung für 400 mval KCl in 0,5 g% Humanalbuminlösung ergibt eine Inaktivierung von 260 Kaliumionen / Humanalbumin-Molekül.

Die Anlagerung von Kaliumionen an Humanalbumin ist bei pH 2 und 3 aufgehoben, bei pH 10 vermindert.

Mit zunehmendem Alter der Lösungen steigt die Inaktivierung von Kaliumionen stark an, und es werden auch Natriumionen osmotisch unwirksam gebunden.

Durch Rinderalbuminlösungen werden Kaliumionen in der gleichen Größenordnung wie durch Humanalbumin osmotisch inaktiviert.

In Pseudoglobulin vom Menschen und in Pferdealbumin besteht kein Unterschied der Osmolarität zwischen Natrium und Kalium und damit keine osmotische Inaktivierung beider. Die Erscheinungen der Alterung werden bei allen Lösungen beobachtet. Die Ergebnisse werden mit Beobachtungen in der Zelle verglichen. Die Art der Bindung der Kaliumionen an Humanalbumin unter Berücksichtigung der einzelnen Befunde wird diskutiert.

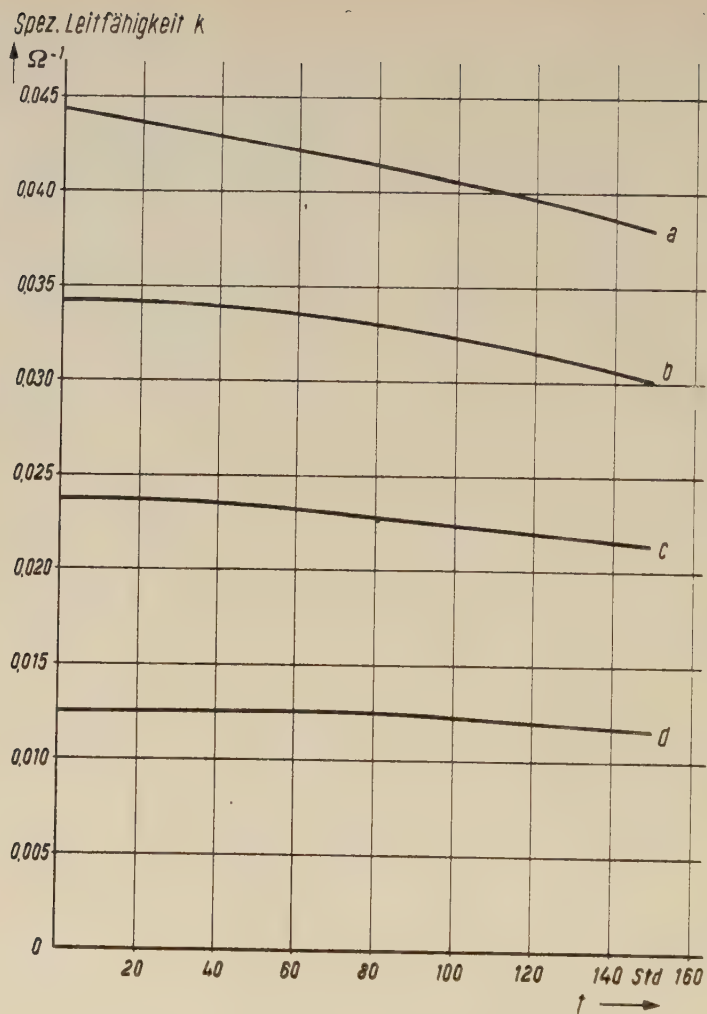


Abb. 6: Alterung der 0,5 g% Humanalbumin-NaCl-Lösungen von:

- a = 400 mval NaCl
- b = 300 mval NaCl
- c = 200 mval NaCl
- d = 100 mval NaCl

Spez. Leitfähigkeit k

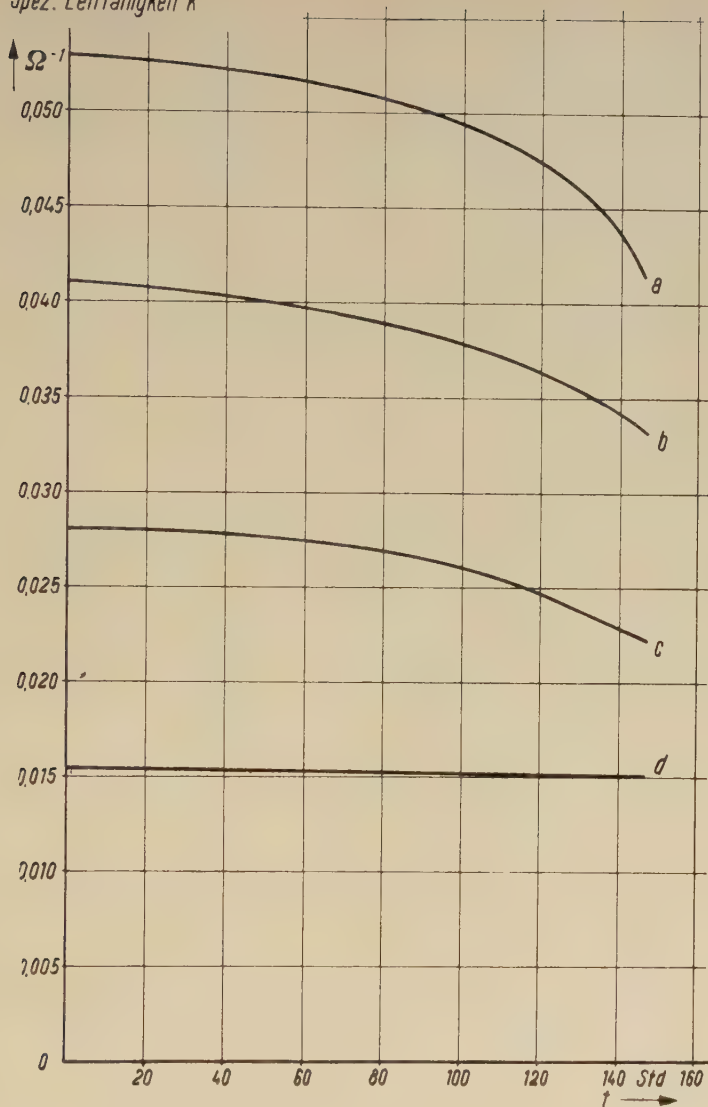


Abb. 7: Alterung der 0,5 g% Humanalbumin-KCl-Lösungen von:

a = 400 mval KCl

b = 300 mval KCl

c = 200 mval KCl

d = 100 mval KCl

G. Literatur-Verzeichnis

1. Klotz, J. M.: Protein Interactions, Proteins, Band I, Teil B.
2. Neurath, H., and Bailey, K.: The Proteins I B, S. 795, Academic Press New York, 1953.
3. Lehnartz, E., und Flaschenträger, B.: Physiolog. Chemie, Der Stoffwechsel, II. Band, 1. Teil, Bandteil a, S. 624, Springer Verlag 1957.
4. Welt, Orloff, Kydd, and Oitman: An Example of cellular Hyperosmolarity, J. clin. Invest. 29: 935 (1950).
5. Elkinson, Winkler, and Danowsky: Transfers of Cell Sodium and Potassium in experimental and clinical Conditions, J. clin. Invest. 27: 74 (1948).
6. Neunhöffer, O., und Kabot, B.: Osmotisch nicht wirksame Kaliumionen in Gegenwart von Humanalbumin. Die Naturwissenschaften 8: 261 (1957).
7. Hallmann: Klinische Chemie und Mikroskopie.
8. Heilmeyer, L.: Spezielle patholog. Physiologie, S. 67, Gustav Fischer Verlag 1955.
9. Prutton, C. F.: Fundamental Principles of Physical Chemistry, The Macmillan Company, 1957.
10. Rein, H., und Schneider, M.: Physiologie des Menschen, S. 48, Springer Verlag, 1956.
11. Laragh, J. H.: The Effect of KCL in Hyponatremia, J. clin. Invest. 33: 807 (1954).
12. Leonard, C. A., and Harrison, J. W. E.: Effect of hyperthermic Shock on free and bound potassium levels. J. am Pharmaceut. Assoc. Scient. Ed. 45: 116 (1956).
13. Tristram: Advances in Protein Chemistry 5: 83 (1949).
14. Kern, W.: Makromolekulare Chemie Band II, S. 48 (1948).
15. Tannhäuser, S. J.: Lehrbuch der Stoffwechselkrankheiten, S. 934 ff. Georg Thieme Verlag, 1957.
16. Cannon, P. R., Frazeir, L. E., and Hughes, H. R.: Influence of Potassium on Tissue Protein Synthesis. Metabolism 1: 49 (1952).
17. Wuhrmann, F., und Wunderly, C.: Die Bluteiweißkörper des Menschen, S. 33, 160. Benno Schwabe Verlag, Basel (1957).
18. Taschenbuch für Chemiker.
19. Putnam, F. W.: Protein Denaturation, Proteins Band I, Teil B, Chapter 9.
20. Anson: Advances in Protein Chemistry, 2: 361 (1945).
21. Waugh: Advances in Protein Chemistry, 9: 325 (1954).

Herr Priv.-Doz. Dr. E. Buchborn hat mir das Thema dieser Arbeit überlassen und mich durch viele wertvolle Ratschläge und Hinweise unterstützt. Ich bin ihm dafür zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. H. Schwiebk danke ich für die Übernahme des Correferats.

Bei der technischen Durchführung der Untersuchungen hat mir Fräulein C. Henschel liebenswürdigerweise geholfen. Auch ihr möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Lebenslauf

Am 15. Mai 1936 wurde ich als Tochter des Dipl.-Ing. Hans Rjosk und seiner Ehefrau Friedel, geb. Reichwein, in Berlin geboren.

Von 1942 bis 1945 besuchte ich die Volksschule in Berlin-Hermsdorf und dann — kriegsbedingt — in Daubitz O/L, Kloster-Allendorf und München-Solln. Nach vierjährigem Besuch des Theresien-Gymnasiums in München trat ich 1949 zum Realgymnasium der Englischen Fräulein München-Nymphenburg über und bestand dort 1954 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1954/55 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und legte hier im März 1957 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1957 und im Wintersemester 1957/58 studierte ich im Rahmen des Studentenaustausches an der Freien Universität Berlin. Seit dem Sommersemester 1958 studiere ich wieder in München und beendete hier am 15. Juni 1960 das medizinische Staatsexamen.

